R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA
LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA

4.

O. VERONA

SUI BACILLI RADICALI

DEL

SENECIO VULGARIS, L.

PISA
TIPOGRAFIA MARIOTTI PACINI
1927

O. VERONA

SUI BACILLI RADICALI

DEL

SENECIO VULGARIS, L.

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto superiore Agrario di Pisa.*
Anno 1927.

Il concetto che tra batteri e piante venissero a stabilirsi azioni mutualistiche, si delineò dopo che Frank, per il primo, e altri in seguito, studiarono e descrissero la simbiosi radicale di alcuni ifomiceti. Frank stesso [1] chiamò tale associazione con il nome di « MICORIZA » distinguendola in *endotrofica* ed *ectotrofica*, a seconda che essa interessasse l'interno o l'esterno dei tessuti corticali della radice.

Schlicht,[2] più tardi, definì il fatto *normale* e già Frank,[3] e poi Stojanow,[4] Beau[5] e numerosi altri indagarono sul suo significato biologico, ammettendo i piú che la micoriza fornisse alla pianta o azoto o acqua o sali minerali, in cambio di sostanze carboidrate.

Quale sia la funzione specifica delle micorize rimane però a tutt'oggi molto incerto e Petri.[6] anzi non esita ad

---

[1] Bot. Ztg, 1879, Bd. 37, p. 832.

[2] Inaug. Dissert. Erlangen, 1889.

[3] FRANK B. — *Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernaehrung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze.* Ber. d. deut. bot. Ges. 30, 1885.

[4] STOJANOW N. — *Ueber die negative Fortpflanzung der Ophrydineen.* Flora N. F., Bd. 9, 1916.

[5] BEAU C. — *La symbiose fungique des orchidées et l'adaptation à la vie xèrophile.* Revue Scient. 1914.

[6] PETRI L. — *Le nostre cognizioni attuali sul significato fisiologico delle micorize degli alberi.* Boll. inform. agrarie e Pat. veg. dell'Ist. int. d'Agric. Anno VI, n. 9.

affermare come la presenza di esse non rappresenti alcuna necessità fisiologica per le piante e che sia dubbio il vantaggio che queste possono ricavarne.

Dopo la simbiosi, ormai - se non completamente - lungamente studiata e descritta del *Bact. radicicola,* i primi studi di associazioni batteriche con piante verdi si ebbero con von Faber [1] che isolò dalle parti aeree di numerose rubiacee un batterio azotofissatore che descrisse come *Bact. rubiacearum.* Quindi H. Miehe [2] illustrò la simbiosi di una forma - *Bac. foliicola* - in *Ardisia crispa,* che si trasmetterebbe ereditariamente. Georgevitsch [3] in *Kraussia floribunda;* Cauda [4] in numerose specie della famiglia delle crucifere; Perotti e Cortini-Comanducci [5] in numerose piante fanerogame trovarono bacilli radicali. Perotti studiò in modo particolare i bacilli della *Diplotaxis erucoides* [6] e della *Ca-*

---

[1] V. Faber F. C. — *Die Bakteriensymbiose der Rubiacearum.* Jahrb. f. wiss. Bot. 5. 1914.

[2] Miehe H. — *Weitere Untersuchungen ueber die Bakteriensymbiose bei « Ardisia crispa ».* Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. LIII, 1913.

— *Ueber die Knospensymbiose bei « Ardisia crispa ».* Ber. d. deutsch. Bot. Ges. 1916.

— *Weitere Untersuchungen über die Bakteriensymbiose bei « Ardisia crispa ».* II. *Die Pflanze ohne Bakterien* Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. LVIII, 1917.

[3] Georgevitsch V. — *A new case of symbiosis between a Bacillus and à plant.* Kew Bullet. Misc. Inform. 1916 n. 4.

[4] Cauda A. — *Presenza abituale di un microrganismo nelle radici delle Crucifere.* Agric. Ital. 1915.

— *Gruppi vegetali fissatori di azoto libero. Il microrganismo dello Crucifere « Bac. cruciferae ».* Nuovo giorn. bot. ital. vol. XXVI, 1919.

[5] Perotti R. e Cortini-Comanducci J. — *Normale presenza di batteri nelle radici di numerose fanerogame.* Rend. R. Acc. Naz. dei Lincei vol. XXXI 1922.

[6] Perotti R. — *Su la presenza di una specie batterica nelle radici della Diplotaxis erucoides* D. C. - Rend. R. Acc. Naz. dei Lincei, vol XXVIII, 1919.

lendula officinalis.[1] Intesa nel senso che la simbiosi radicale, se pur non necessaria, risulti vantaggiosa per l'individuo ospite, Perotti la ritiene come *normale,* e, per analogia col termine e concetto di micoriza, la distinse col nome di « BATTERIORIZA ».[2]

Nell'intento di portare un nuovo - sebbene modesto - contributo alla conoscenza della batterioriza, ho preso in esame, in questi ultimi tempi, i batteri radicali del *Senecio vulgaris,* L., e di essi vengo a riferire con la presente Nota.

Si rinvengono negli strati corticali e subcorticali delle radici secondarie, negli spazi intercellulari e, non di rado, nelle cellule medesime; ma sopratutto si rendono evidenti spappolando una porzione di radice in acqua.

Per il loro isolamento fu allestito un substrato a base di *Senecio*, agarizzando all'1,5 % il decotto ottenuto da 150 gr. di piante seccate all'aria con 1000 di acqua e 20 di saccarosio.

Il materiale d'inoculazione era costituito da più esemplari provenienti dai campi del podere sperimentale del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa.

Fu preparato lo stemperamento acquoso del materiale, lavandolo ripetutamente, prima con una soluzione di subli-

---

PEROTTI R. — *Ulteriori ricerche sui bacilli radicali della Diplotaxis erucoides.* D. C. Rend. R. Acc. Naz. dei Lincei. vol. XXIX, 1920.

— *Ancora sui bacilli radicali della Diplotaxis erucoides.* D. C. - Rend. R. Acc. Naz. dei Lincei, vol. II, serie 6. 1926.

[1] PEROTTI R. e ZAFFUTO G. — *Sui bacilli radicali della Calendula officinalis.* L. - Rend. Acc. Naz. dei Lincei, vol. XXXII, 1923.

[2] PEROTTI R. — *La « batterioriza ».* Riv. di Biologia, vol. V, fasc. 4.

mato, poi con acqua al fine di eliminare il più possibile le eventualità di inquinamenti: infine con esso vennero allestite colture a piatto con agar-*Senecio* e agar fagiuoli.

Dopo 3-4 giorni di coltura a 25° C. notai il costante e predominante sviluppo di colonie superficiali, piuttosto grandi, isolate, semitrasparenti, incolori, di consistenza membranaceo-mucosa, rotonde od ellittiche, piatte, leggermente frangiate.

In coltura a strisciamento, sia su agar-*Senecio*, che agar-fagiuoli si formò patina continua, estesa, semitrasparente, membranacea, liscia, sinuosa, scolante nell' acqua di condensazione che rimane limpida e sulla quale si forma sottile pellicola. Su agar-peptone lo sviluppo fu molto maggiore.

Nei brodi la forma si sviluppa notevolmente intorbidando il liquido e formando in superficie pellicola e in fondo abbondante deposito fioccoso.

Nelle infissioni in gelatina si sviluppa superficialmente e fluidifica prima a coppa, indi a cilindro e si deposita al fondo della parte liquefatta.

Nel latte determina lenta, ma completa coagulazione.

Non produce acidi.

All' esame microscopico i diversi stipiti si mostrarono costituiti da una forma la cui breve diagnosi può essere la seguente:

« *Corti bastoncini di* $\mu\ 2 \times 3 - 3{,}5$ *non di rado abbinati, mobilissimi, ma perdenti presto la loro mobilità. Prendono bene i colori di anilina, lentamente la fucsina carbolica di Ziehl. Sono Gram-positivi, non sporulanti, liquefacenti la gelatina di carne, coagulanti il latte* ».

Per determinare le esigenze nutritive di questa forma,

la coltivai in soluzioni di determinata composizione chimica avendo speciale riguardo alla utilizzazione delle differenti sorgenti di azoto.

Le soluzioni furono preparate partendo dalla seguente soluzione minerale:

fosfato bipotassico	gr. 1. —
cloruro di calcio	» 0 1
solfato di magnesio	» 0.3
cloruro di sodio	» 0.1
cloruro ferrico	» 0.01
acqua	cc. 1000

e aggiungendo ad essa per alcune colture asparagina, per altre nitrato potassico ed infine, solfato ammonico nelle proporzioni dell'1 %. Nei liquidi risultanti aggiunsi o glucosio nella proporzione dell' 1 %, o saccarosio o lattosio nelle proporzioni del 0,5 %.

L'esame delle colture fu eseguito all'ottavo e al quindicesimo giorno dall'inoculazione: i risultati ottenuti furono i seguenti:

1. sorgente di azoto: solfato ammonico. Leggero sviluppo in presenza di lattosio; nullo in presenza di saccarosio e di glucosio.

2. sorgente di azoto: nitrato potassico. Sviluppo quasi nullo in presenza di lattosio; debole in presenza di saccarosio e di glucosio.

3. sorgente di azoto: asparagina. Sviluppo rigoglioso anche in assenza di carboidrati. In presenza di glucosio e di saccarosio lo sviluppo fu abbondante sotto l'aspetto di forte intorbidamento del liquido, sottile coperta e copioso

deposito fioccoso. In presenza di lattosio lo sviluppo fu sensibilmente minore.

In altri termini la sorgente di azoto più adatta per lo sviluppo della forma fu l'azoto amidico; come sorgente di carbonio risultarono utilizzati in special modo glucosio e saccarosio.

Ulteriori ricerche furono istituite per stabilire se e quale dei principali processi microbiochimici del terreno agrario la forma fosse capace di attivare.

Piú specialmente:

1. il suo potere ammonizzante, coltivandola in soluzione di peptone Witte all'1,5 % per quattro giorni a 20 25° C.

2. il suo potere di nitrificazione, coltivandola per 25 giorni a 20-25° C. in soluzione acquosa al 2 ‰ di solfato ammonico e fosfato bipotassico con aggiunta del 2 % di carbonato di magnesio.

3. il suo potere di denitrificazione, coltivandola nella nota soluzione di Giltay.

4. il suo potere di assimilazione dell'azoto, coltivandola per 40 giorni a 20-25° C. in una soluzione acquosa al 20 ‰ di mannite, 0,2 % di fosfato bipotassico in presenza di carbonato di calcio.

Nella soluzione di peptone notai un discreto sviluppo ma assenza completa di ammoniaca.

Nella soluzione di Omeliansky, sviluppo abbondante e *leggera* formazione di nitrati.

Nel liquido di Giltay abbondante sviluppo ma nessuna riduzione.

Nella soluzione di Beijerinck assenza di sviluppo.

Dai risultati avuti sembrerebbe quindi che ai batteri del *Senecio* dovesse ascriversi un leggero potere nitrificante ma ciò non si vede quanto in accordo con le ricerche numerose eseguite sui nitrificanti in genere e dalle quali risulta come i nitrificanti non tollerano tracce anche minime di sostanze organiche ed hanno condizioni molto singolari di sviluppo. Non intendo per il momento di interpretare la constatazione fatta, finchè altre ricerche in corso nel Laboratorio non la confermino o la chiariscano.

Altre indagini, infine, indirizzai a stabilire se, e fino a qual punto, la forma avesse azione sui carboidrati insolubili e sui grassi; poichè era presumibile che, oltre ad un'azione proteolitica il batterio esercitasse una qualche azione sulle sostanze ternarie analogamente a quanto Perotti stabiliva per i bacilli della *Diplotaxis erucoides*, D. C.

Al riguardo allestii per i carboidrati colture costituite da cc. 200 di brodo di fagiuoli non zuccherato e gr. 20 di fecola di patate.

Due beute le lasciai di controllo e due le inoculai con uno stemperamento in acqua sterile di una coltura del microrganismo. Coltivai a 20 25° C. per 15 giorni, determinando al termine del quindicesimo giorno gli zuccheri riduttori presenti nei controlli e nelle Erlenmeyer inoculate.

I risultati avuti furono i seguenti:

	Zuccheri riduttori formatisi da gr. 20 di fecola.
Controllo I	gr. —
» II	» —
Coltura attiva I	» 1,02
» » II	» 1,05

Si ebbe quindi, come era presumibile dedurre dall'esame macroscopico delle colture (poichè il substrato, solido nelle beute di controllo, divenne in buona parte fluidificato nelle beute inoculate) una solubilizzazione della fecola e, precisamente, nelle condizioni di esperimento, essa fu uguale al 5,02 %.

La secrezione di diastasi amilolitiche da parte del batterio non apparisce comunque rilevante ma tale da lasciar arguire che l'attacco dei carboidrati sia sufficiente alla sua nutrizione senza disturbare il metabolismo dei tessuti in cui la forma vive ed anzi mettendo questi in condizioni di utilizzare idrati di carbonio insolubili.

Per i grassi, agarizzai all' 1,5 % in piccole Erlenmeyer 20 cc. di brodo di fagiuoli aggiungendo od oleina, o palmitina, o stearina nelle proporzioni del 10 %. Coltivai per alcuni giorni a temperatura ambiente senza peraltro notare alcun indizio di trasformazioni nè di sviluppo. Pensando che una dose troppo forte di grassi avesse potuto in qualche modo nuocere alla forma portai la percentuale di essa al 5 %. Anche in queste prove però — sebbene lo sviluppo si fosse iniziato — non ebbi modo di constatare alcun attacco.

Concludendo, nel batterio simbionte del *Senecio vulgaris* L. è stata dimostrata un' azione proteolitica e amilolitica. Nei tessuti delle radici della pianta verde esso potrebbe quindi favorire il metabolismo di sostanze albuminoidi e carboidrate ed in tal senso sarebbe da ammettersi l'azione mutualistica intercorrente tra pianta e batterio.

Ringrazio il Prof. R. Perotti, Direttore del Laboratorio, per i consigli e gli aiuti cortesemente fornitimi.

Dal Laboratorio di Batteriologia Agraria
del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa, marzo 1927.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

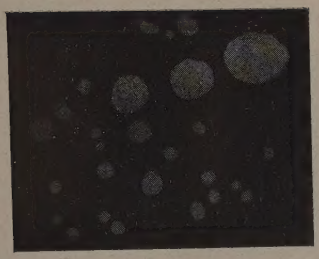
Fig. 1 Colonie su agar-fagiuoli.

» 2 Striscio su agar-fagiuoli (giorni 7 di coltura).

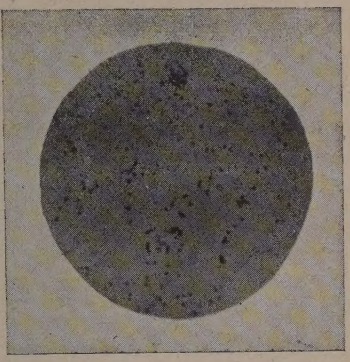
» agar-peptone (» 7 »).

» 3 Infissione in gelatina di carne (giorni 7 di coltura).

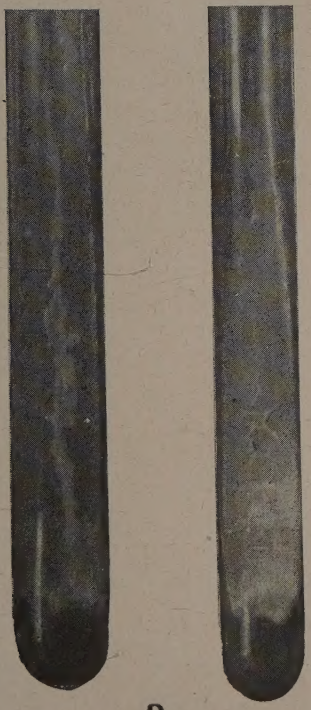
» 4 Microfotografia della forma (preparato con violetto di genziana). Ingr. 800 diametri circa.



1



4



2

3